

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta  
tese será disponibilizado somente  
a partir de 01/06/2019.

**José Antonio Santos Souza**

**NANOPARTÍCULAS DE PRATA OBTIDAS PELA  
SÍNTESE ‘GREEN’ COMBINADAS OU NÃO COM  
GLICEROFOSFATO DE CÁLCIO E TIROSOL: EFEITO  
ANTIMICROBIANO, ANTI-INFLAMATÓRIO E NA  
RESPOSTA TRANSCRIPTÔMICA EM PATÓGENOS  
ORAIS**

**ARAÇATUBA - SP**

**2018**

**José Antonio Santos Souza**

**Nanopartículas de prata obtidas pela síntese ‘green’ combinadas ou não com glicerofosfato de cálcio e tirosol: efeito antimicrobiano, anti-inflamatório e na resposta transcriptômica em patógenos orais**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba para obtenção do título de Doutor em Ciência Odontológica, área de concentração Saúde Bucal da Criança.

Orientador: Prof. Tit. Alberto Carlos B. Delbem

**ARAÇATUBA - SP**

**2018**

Catálogo-na-Publicação

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S729n Souza, José Antonio Santos.  
Nanopartículas de prata obtidas pela síntese 'green'  
combinadas ou não com glicerofosfato de cálcio e tirosol :  
efeito antimicrobiano, anti-inflamatório e na resposta  
transcriptômica em patógenos orais / José Antonio Santos  
Souza. - Araçatuba, 2018  
186 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Orientador: Alberto Carlos Botazzo Delbem

1. Candidíase bucal 2. Cárie dentária 3. Nanotecnologia  
4. Prata 5 Toxicidade I. T.

Black D27  
CDD 617.645

## ERRATA

SOUZA, J.A.S. **Nanopartículas de prata obtidas pela síntese ‘green’ combinadas ou não com glicerofosfato de cálcio e tirosol: efeito antimicrobiano, anti-inflamatório e na resposta transcriptômica em patógenos orais.** 2018. 186 f. Tese (Doutorado em Ciência Odontológica, área de concentração Saúde Bucal da Criança) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, 2018.

<b>Folha</b>	<b>Linha</b>	<b>Onde se lê</b>	<b>Leia-se</b>
8	1	<i>À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)</i> Pelo grande incentivo nas formas de Bolsa de Doutorado (FAPESP, Processo 2015/00825-5) e de Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE, Processo 2016/22039-4).	<i>À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES/DS</i> Pelo grande incentivo na forma de Bolsa de Doutorado, no seguinte período: 01/01/2015 a 30/06/2015.  <i>À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)</i> Pelo grande incentivo nas formas de Bolsa de Doutorado (FAPESP, Processo nº 2015/00825-5) e de Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE, Processo nº 2016/22039-4).

---

## **DADOS CURRICULARES**

**JOSÉ ANTONIO SANTOS SOUZA**

- NASCIMENTO** 07/09/1990 – Clementina – SP
- FILIAÇÃO** João Carlos de Souza  
Mariauva Ribeiro dos Santos Souza
- 2008/2011** Curso de Graduação em Odontologia  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
- 2012/2014** Curso de Pós-Graduação em Ciência Odontológica, área de concentração Saúde Bucal da Criança, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP
- 2015/2017** Obtenção dos créditos referentes ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Odontológica, área de concentração em Saúde Bucal da Criança, nível de Doutorado
- 2015/2016** Curso de Especialização em Odontopediatria, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP
- Associações** CROSP – Conselho Regional de Odontologia de São Paulo  
SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica
-

---

## DEDICATÓRIA

### *Aos meus queridos pais: João Carlos e Mariauva*

A vocês, queridos pais, que dedicaram suas vidas em favor da minha vida. Foram muitas as batalhas que travamos ao longo destes anos, mas o Senhor Deus nos concedeu a vitória em todas elas. Vocês nos ensinaram a obedecer, a respeitar, a ensinar e, principalmente, a amar os nossos semelhantes. Por esta razão, cheguei até aqui. Sem vocês, nada disso teria acontecido. Sendo assim, dedico esta vitória a vocês, que já são, aqui na terra, merecedores do Reino dos Céus. “Como é grande o meu amor por vocês”.

### *A minha irmã: Izabella*

Você é mais que uma amiga e companheira; é um anjo que Deus colocou em minha vida para me alegrar, me fazer sorrir e chorar. Estará para sempre em meu coração. Obrigado pela força, pelos conselhos e pelas “brigas”, rs. Amo você.

### *Aos meus amigos*

Orgulho-me de olhar para trás e ver uma longa jornada já percorrida, mas me alegro ainda mais ao ver quantos bons amigos eu conquistei em meio a essa caminhada.

---

---

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

### *A Deus*

Senhor, desde o ventre de minha mãe, já me conhecias, porque Tu me criaste com carinho e amor. Diante disso, agradeço pelo dom da vida. Tu me acompanhaste na minha infância e na minha adolescência sempre me corrigindo com carinho e atenção. Agradeço pelas correções, pois, através delas, cresci em sabedoria e graça diante de Ti e diante dos homens. Passei por dificuldades e encontrei obstáculos em meu caminho, mas Tu não me abandonaste em meio às tempestades. Hoje, é um dia de muita alegria, pois conquistei mais uma vitória em minha vida. Assim, venho te louvar, agradecer e engrandecer por esse momento que proporcionaste para mim. Obrigado Senhor!!

### *Aos meus pais e à minha irmã*

Aos meus pais, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, nós, seus filhos, pudéssemos realizar os nossos, não bastaria um muitíssimo obrigado. Faltam palavras para expressar minha gratidão por vocês. Agradeço pelas correções fraternas. Eu sei que foram feitas com amor e sabedoria visando o meu crescimento pessoal. Vocês nos mostram diariamente como uma família deve se comportar: Amando a Deus sobre todas as coisas e ao próximo como a nós mesmos, seguindo assim os belíssimos ensinamentos do Mestre Jesus Cristo. Izabella, agradeço pela sua companhia. Com certeza, Deus te colocou em meu caminho para ser meu anjo guardião. Também não há palavras que expressam meu amor incondicional por você. Assim, agradeço por estarem ao meu lado neste momento grandioso da minha vida. Sem vocês, não teria sentido receber este título.

### *A minha família*

A família sempre está ali, pronta para o que der e vier, não espera nada em troca. Neste momento, tão especial em minha vida, é claro que não poderia deixá-los de agradecer. Obrigado pelas orações, apoio, respeito e paciência. Desculpem-me por não ter compartilhado com vocês algumas conversas, risadas, almoços, entre outras coisas. Saibam que vocês sempre ocuparão um lugar especial em meu coração e em minhas

---

---

orações. Por esta razão, agradeço a vocês que me ajudaram em minha formação. Meu muito obrigado!!

***Ao meu orientador Prof. Alberto Carlos Botazzo Delbem***

Ser mestre não é apenas lecionar, ensinar não é apenas transmitir o conteúdo programático. Ser mestre é ser orientador e amigo, guia e companheiro, é caminhar com o aluno passo a passo. É transmitir a este os segredos da caminhada. É por isso e muito mais que agradeço, a você meu orientador, cada dia, cada oportunidade que tive ao seu lado, o senhor será sempre um exemplo de dedicação, de doação, de dignidade pessoal e de amor. Obrigado por tudo!

***À Prof<sup>a</sup>. Débora Barros Barbosa***

A realização deste trabalho não seria possível sem a sua colaboração. Obrigado pela oportunidade de ter trabalhado com a Sra. ao longo destes 4 anos. Seu contato com o Prof. Nuno fez com que eu pudesse fazer meu doutorado sanduíche. Muito obrigado!! A Sra. é um verdadeiro exemplo de pessoa íntegra, generosa e competente. A sua paixão pela pesquisa serve de estímulo para que eu possa seguir trilhando neste caminho. Um grande abraço de carinho e eterna gratidão.

***À Prof<sup>a</sup>. Sandra Helena Penha de Oliveira***

Obrigado pela acolhida em seu grupo de pesquisa e por permitir a utilização do seu laboratório para o desenvolvimento deste trabalho. Foi um prazer trabalhar ao seu lado!! Espero ter outras oportunidades.

***Ao meu orientador estrangeiro Prof. Nuno Gonçalo Pereira Mira***

No período de 2017-2018, fiz meu doutorado sanduíche sob a orientação do Prof. Nuno Mira. Foi uma experiência ímpar em minha vida. Obrigado professor pela recepção em seu grupo de pesquisa, pelos momentos de descontração e, também, pelas correções visando nosso aprendizado. Além disso, nós agradecemos a sua importante participação na minha banca de Defesa de Tese. Obrigado por tudo!

---

---

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)*

Pelo grande incentivo nas formas de Bolsa de Doutorado (FAPESP, Processo 2015/00825-5) e de Bolsa de Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE, Processo 2016/22039-4).

---

---

## AGRADECIMENTOS

À *Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP*, na pessoa de seu diretor *Prof. Tit. Wilson Roberto Poi*, pela oportunidade de aprendizado e crescimento pessoal e profissional.

Ao atual *coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência Odontológica*, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, *Prof. Adj. Luciano Tavares Angelo Cintra*, pela competência e acessibilidade.

Ao *Departamento de Química* da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar e ao *LIEC (Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica)*, por permitirem a realização da síntese das nanopartículas de prata.

Ao *Prof. Emerson Camargo*, por ter contribuído com o desenvolvimento desta pesquisa.

À *APIS FLORA INDUSTRIAL E COMERCIAL LTDA*, onde parte fundamental deste trabalho foi realizado com a ajuda de extrema importância de alguns dos alunos e funcionários em especial Andrei, Elina e Rebeca.

Ao *Departamento de Ciências Básicas*, pela receptividade, pelas novas amizades e pelo carinho com a minha pessoa.

À *Pesquisadora Dr<sup>a</sup>. Alessandra Marçal Agostinho*, por ter colaborado com o desenvolvimento deste Projeto. Suas correções foram fundamentais para a publicação do nosso primeiro artigo e, também para o meu aprendizado.

À *Dra. Jackeline Gallo do Amaral, ao Dr. Renan Aparecido Fernandes, ao Dr. Luiz Fernando Gorup, ao Pós-doutorando Francisco Nunes de Souza Neto e à aluna de Doutorado Gabriela Lopes Fernandes*, pelo companheirismo e pela ajuda no desenvolvimento desta pesquisa.

---

---

À *Dra. Aline Satie Takamiya*, pessoa gentil, educada e muito competente. Obrigado de coração, pela amizade, pelo incentivo, pela paciência e pelo carinho com que sempre me tratou. Obrigado por todo conhecimento que dividiu comigo e por toda a ajuda na execução deste trabalho. Foi um prazer ter convivido com você nestes últimos anos.

Ao *Instituto Superior Técnico* e ao *Departamento de Bioengenharia e Biociências*, pela receptividade, pelas novas amizades e pelo carinho com a minha pessoa.

À *Prof.<sup>a</sup> Isabel Sá-Correia*, pela receptividade em seu Departamento.

Aos alunos de Pós-Graduação *Sara Salazar, Nuno Pedro e Rita*, pela ajuda no desenvolvimento desta pesquisa no Departamento de Bioengenharia e Biociências do Instituto Superior Técnico durante o meu doutorado sanduíche.

À *Pós-Doutoranda Marta*, pela ajuda na caracterização das nanopartículas no início dos nossos estudos em Lisboa, Portugal e dos biofilmes na presença dos compostos avaliados. Sua ajuda e amizade foram essenciais para o bom êxito deste trabalho.

Aos meus *amigos brasileiros que conheci em Lisboa: Rejane, Carmem, Diego, Abdon, Mateus, Bárbara, Soraia, Eloá, Pe. Robson, Daniel, Oswaldo, Inah Mara, Marina, Thiago, Cris, Gisele; aos meus amigos colombianos e venezuelanos: Leslye, Pino e Piedy; aos grandes amigos estrangeiros: Sileshi Demesie, Aldona, Chaima, Luan, Giovanni, Isabel Bento, Alexey; aos colegas de Departamento de Bioengenharia e Biociências: Tiago, Diana, João, Mafalda, Marta, Isabel Seixas, Nuno Bourbon, Rúben, Andréia, Carina Galhofa, Sara Gomes, Joana Correia, Inês Sá, Jéssica Alexandra, Maria João, Ana, Pedro, ao professor Miguel Teixeira, Ricardo, Carla Coutinho, Luís, Cláudia, Joana, Mônica, Romeu, Miguel, André, Nuno Bernardes, Margarida; aos professores do Departamento de Química do Instituto Superior Técnico*, agradeço por terem me recebido com muito carinho e por terem me ajudado nos experimentos.

Aos meus *amigos do Coro Gerações da Paróquia São João de Deus em Lisboa: Philippe Catarino (nosso maestro), Nuno Eusébio, Diogo, Nela Cabral, Tina Melo, Andréia*

---

---

*Amorim, Carina Brandão, Arlete, e demais integrantes do grupo*, agradeço de coração sincero pela acolhida no coral. Vocês são muito especiais! Que Deus os abençoe!

Às *funcionárias da Residência dos Baldaques: Ana Bela, Cândida e Cecília (in memoriam)*. Obrigado por terem me tratado como um filho! Realmente, me senti em casa!

Aos colegas do *Departamento de Ciências Básicas: Victor, Murilo, Jéssica, Rodrigo, Sabrina, Mariana, Kellen, Wanessa, Maria Fernanda, José Vitor, Beatriz, Carol, Cau, Laura, Vitor Bonetti, Ayná, aos professores: Antônio, Cristina, Rita, João, Ana Cláudia, Dóris* pelo convívio no laboratório. Muitas vezes, vocês alegraram meu dia!

Aos meus queridos amigos do *Departamento de Odontopediatria: Liliana, Thayse, Márjully, Mariana Nagata, Karina Caiaffa, Caio Sampaio, Vanessa, Jéssé, Nayara, Mayra, Jorge, Isabel, Luhana, Leonardo, Gabriel, Sara, Francynne, Priscila, Emanuelle, Lenara, Sâmia, Valéria, Igor, Laís, Douglas, Marcelle Danelon, Thamires, Heitor, Carla Mendes, Ana Paula, Isabela, Silvio, Suéllen, Carla Favretto*. Obrigado pelo convívio, pelas parcerias. Desculpem-me por alguma coisa... Amo vocês!

Aos *Profs. Robson Frederico Cunha, Célio Percinoto, Rosangela Santos Nery, Sandra Maria Herondina Ávila de Aguiar, Juliano Pelim Pessan e Cristiane Duque*, pela orientação não só no âmbito da pesquisa, mas, principalmente, na área clínica. Durante o curso de Especialização, aprendi muito com vocês. Além disso, nossos momentos de descontração ficarão guardados em meu coração. Amo vocês. Obrigado por tudo!

Às excelentes funcionárias da seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, *Valéria e Cristiane*, pelo apoio, suporte e ajuda a mim dispensados.

Aos funcionários do departamento de Odontopediatria *Ricardo*, pelo carinho e preocupação e *Mário*, pela amizade e ajuda; aos *funcionários da disciplina de Ortodontia Bertolina e Luís* pela ajuda na organização do departamento; aos funcionários da Biblioteca, em especial a *Ana Paula e Cláudio*, por sempre me acolherem nos momentos de dúvidas e por sempre estarem dispostos a ajudar.

---

---

Aos meus pequenos pacientes e responsáveis, obrigado pela sua paciência, pelo seu respeito ao nosso aprendizado, pela sua colaboração e incentivo ao nosso aprimoramento técnico-científico. Talvez a minha ajuda ainda seja pequena diante do universo carente em que vocês corajosamente vivem, mas ajudá-los está representando para mim uma magnífica lição de amor e fraternidade.

---

---

*“A santidade não está nesta ou naquela prática, ela consiste numa disposição do coração que nos torna humildes e pequenos nas mãos de Deus, conscientes de nossa fraqueza, e confiantes até a audácia na sua bondade de Pai.”*

*Santa Teresa de Lisieux*

---

---

Souza JAS. **Nanopartículas de prata obtidas pela síntese ‘green’ combinadas ou não com glicerofosfato de cálcio e tirosol: efeito antimicrobiano, anti-inflamatório e na resposta transcriptômica em patógenos orais** [tese]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2018.

## RESUMO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana/antibiofilme e a viabilidade celular de nanopartículas de prata (NPsAg) obtidas por uma síntese ‘green’ associadas ou não ao  $\beta$ -glicerofosfato de cálcio (GPCa) contra *Streptococcus mutans* e espécies de *Candida* (cepas de referência e isolados clínicos orais incluindo cepas resistentes ao fluconazol). O efeito destes nanocompostos em combinação com o tirosol (TIR), fluconazol (FLC), nistatina (NIT) e anfotericina B (AnB) também foi avaliado. Além disso, nós avaliamos comparativamente as alterações do transcriptoma de células de *C. glabrata* CBS138 após exposição às NPsAg e ao Íon prata ( $Ag^+$ ). Inicialmente, as NPsAg foram sintetizadas por meio da redução do nitrato de prata com extratos de diferentes partes (casca, folha e semente) de uma romã (*Punica granatum L.*) associadas ou não ao GPCa. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e as Concentrações Fungicida/Bactericida Mínima (CFM e CBM) dos nanocompostos (NPsAg e NPsAg-GPCa) associados ou não ao TIR contra *S. mutans* e *C. albicans* foram determinadas pelo método de microdiluição. E, a ação das NPsAg combinadas com FLC, NIT e AnB também foi avaliada em condição planctônica contra isolados clínicos orais de espécies de *Candida*. O efeito dos nanocompostos associados ou não ao TIR sobre a viabilidade celular de fibroblastos da linhagem L929 e a produção de citocinas foi avaliado através dos ensaios de MTT e ELISA, respectivamente. O número de hifas foi quantificado em biofilmes de *C. albicans* formados na presença das NPsAg com ou sem soro fetal bovino (SFB). O efeito das NPsAg em inibir a formação do biofilme (em *C. albicans* e *C. glabrata*) também foi investigado através do ensaio de PrestoBlue e por meio da microscopia eletrônica de varredura. Os nanocompostos (NPsAg e NPsAg-GPCa) associados ou não ao TIR foram aplicados sobre biofilmes de *S. mutans* e de espécies de *Candida* (12 e 24 h) e, após 24 h de contato, sua atividade antibiofilme foi determinada por meio da enumeração das unidades formadoras de colônias (UFCs) e ensaio de PrestoBlue. Além disso, uma análise transcriptômica foi realizada utilizando microchips de DNA (‘microarrays’) a fim de avaliar quais genes estão mais ou menos expressos como

---

---

resposta às NPsAg (no estado planctônico e formando biofilmes) e ao Íon  $\text{Ag}^+$  (formando biofilmes). As soluções antimicrobianas sintetizadas neste estudo (NPsAg e NPsAg-GPCa) apresentaram atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados. Além disso, menores valores de CIM foram obtidos quando estes nanocompostos foram associados ao TIR, FLC, NIT e AnB apresentando um efeito sinérgico. NPsAg e NPsAg-GPCa não foram tóxicas às células L929, aumentaram a produção de fator de crescimento celular e não promoveram alterações significativas na liberação de Interleucina-6. Os nanocompostos associados ao TIR não apresentaram efeito citotóxico sobre culturas de L929, exceto para a maior concentração (NPsAg – 39,05  $\mu\text{g/mL}$  + TIR – 1,25 mM). A presença das NPsAg reduziu drasticamente o número de hifas em biofilmes de *C. albicans* na presença ou na ausência de SFB. A quantidade de biofilme das espécies de *Candida* formado na presença das NPsAg reduziu para mais de 50%. Após 24 h de tratamento com os nanocompostos (NPsAg e NPsAg-GPCa) em biofilmes de *S. mutans*, houve uma redução significativa no número de UFCs sendo similar à clorexidina. Uma redução na viabilidade de biofilmes de *C. glabrata* também foi observada após exposição às NPsAg (24 h). Entretanto, os nanocompostos (NPsAg e NPsAg-GPCa) associados ou não ao TIR não foram efetivos contra biofilmes de *C. albicans*. Após exposição às NPsAg e ao Íon  $\text{Ag}^+$ , alterações no transcriptoma de células de *C. glabrata* CBS138 foram observadas: no estado planctônico, houve uma superexpressão dos genes responsáveis pela biossíntese de metionina e de lisina e uma subexpressão dos genes relacionados com o transporte transmembrana; e, as células expostas às NPsAg responderam de forma distinta em relação ao Íon  $\text{Ag}^+$ , indicando que as NPsAg podem apresentar um mecanismo de ação diferente. Estes achados podem auxiliar nas decisões terapêuticas com formulações contendo NPsAg ou NPsAg-GPCa associadas ou não a diferentes drogas em pacientes com cárie dentária e candidíase oral.

**Palavras-chaves:** Candidíase Bucal. Cárie Dentária. Prata. Nanotecnologia. Toxicidade.

---

---

Souza JAS. **Silver nanoparticles obtained by the ‘green’ synthesis combined or not with calcium glycerophosphate and tyrosol: antimicrobial, anti-inflammatory effect and in the transcriptomic response in oral pathogens** [thesis]. Araçatuba: UNESP – São Paulo State University; 2018.

## GENERAL ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the antimicrobial/antibiofilm activities and the cell viability of silver nanoparticles (AgNPs) obtained by a ‘green’ synthesis associated or not to  $\beta$ -calcium glycerophosphate (CaGP) against *Streptococcus mutans* and *Candida* species (reference strains and oral clinical isolates including azole-resistant strains). The effect of these nanocompounds in combination with tyrosol (TYR), fluconazole (FLC), nystatin (NYT) and amphotericin B (AmB) also was evaluated. Furthermore, we evaluated, comparatively, the transcriptome alterations of cells of *C. glabrata* CBS138 after exposition to AgNPs and to silver ion ( $\text{Ag}^+$ ). Initially, AgNPs were synthesized by reducing silver nitrate with extracts of different parts (peel, leaves and seeds) of a pomegranate (*Punica granatum L.*) associated or not to CaGP. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal/Bactericidal Concentrations (MFC and MBC) of the nanocomposites (AgNPs and AgNPs-CaGP) associated or not to TYR against *S. mutans* and *C. albicans* were determined by the microdilution method. And, the action of the AgNPs combined with FLC, NYT and AmB also was evaluated in planktonic condition against oral clinical isolates of *Candida* species. The effect of the nanocomposites associated or not to TYR on cell viability of fibroblasts (L929) and cytokines production was evaluated through MTT and ELISA assays, respectively. The number of cells undergoing filamentation was quantified in *C. albicans* biofilms formed in the presence of AgNPs with or without fetal bovine serum (FBS). The effect of AgNPs in inhibit the formation of biofilm (in *C. albicans* and *C. glabrata*) also was investigated through PrestoBlue assay and scanning electron microscope. Biofilms of *S. mutans* and *Candida* species (12 and 24 h) were treated with nanocomposites (AgNPs and AgNPs-CaGP) associated or not to TYR for 24 h and, then, the viability of these biofilms was determined through PrestoBlue assay and colony forming units (CFUs). Moreover, a transcriptome analysis was performed using microarrays to determine which genes are up- or down-regulated as response to AgNPs (in the planktonic state and forming biofilms) and to  $\text{Ag}^+$  ion (forming biofilms). Antimicrobial solutions synthesized in this

---

---

study (AgNPs and AgNPs-CaGP) presented antimicrobial activity against tested microorganisms. Furthermore, lower values of MIC were obtained when these nanocompounds were associated to TYR, FLC, NYT and AmB showing a synergistic effect. AgNPs and AgNPs-CaGP were not toxic to L929 cells, increased the stem cell factor production and did not promote significant alterations in the Interleukine-6 release. The nanocomposites associated to TYR did not present cytotoxic effect on L929 cultures, except for the higher concentration (AgNPs – 39.05 µg/mL + TYR – 1.25 mM). The incubation in the presence of the AgNPs drastically reduced the number of cells exhibiting hyphae, this effect being observed either in the presence or absence of FBS. The amount of biofilm formed by *Candida* species in the presence of the AgNPs was reduced by more than 50% the one formed in the absence of the nanoparticles, this reduction being further increased to more than 90% when the concentration of the AgNPs was increased. After 24 h of treatment with the nanocompounds (AgNPs and AgNPs-CaGP) in *S. mutans* biofilms, there was a significant reduction in the number of CFUs being similar to chlorhexidine. A reduction in the viability of *C. glabrata* biofilms also was observed after exposition to AgNPs (24 h). However, the nanocomposites (AgNPs and AgNPs-CaGP) associated or not to TYR were not effective against *C. albicans* biofilms. After exposition to AgNPs and to Ag<sup>+</sup> ion, alterations in the transcriptome of cells of *C. glabrata* CBS138 were observed: in the planktonic state, genes responsible by the methionine and lysine biosynthesis are up-regulated, and genes related with the transmembrane transport are down-regulated. And, finally, the cells exposed to AgNPs responded differently in relation to the Ag<sup>+</sup> ion, indicating that the AgNPs might present a different mechanism of action. All these results may help guide therapeutic decisions with formulation containing AgNPs or AgNPs-CaGP associated or not with different compounds in patients with dental caries and oral candidiasis.

**Keywords:** Oral Candidiasis. Dental Caries. Silver. Nanotechnology. Toxicity.

---

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>Capítulo 1</b>	<b>‘Green’ synthesis of silver nanoparticles combined to calcium glycerophosphate: antimicrobial and antibiofilm activities.....</b>	<b>39</b>
<b>Figure 1</b>	(A) XRD pattern of the nanocomposites P1, S1 and L1 and CaGP; (B) XRD pattern of the nanocomposites P2, S2 and L2; (C) UV-Visible spectrum of the nanocomposites P1, S1, L1 and CaGP; (D) UV-Visible spectrum of the nanocomposites P2, S2 and L2.....	<b>64</b>
<b>Figure 2</b>	(A) SEM micrographs of nanocompounds: a) P1; b) L1; c) S1; d) P2; e) L2 and f) S2. (B) SEM and EDS mapping of the 2D elements issuance Si K $\alpha$ , O K $\alpha$ , Ca K $\alpha$ , P K $\alpha$ and Ag K $\alpha$ false color. Analysis of the distribution of silver nanoparticles on the CaGP (P1 nanocompound); a) SEM image; b) chemical mapping of silicon element present in the substrate, where the electron beam was focused directly on the substrate and is showed in green color, and the dark regions the beam was focused in P1 nanocomposite; c-f) oxygen, calcium, phosphorus and silver, respectively, demonstrating they are constituents of the P1.....	<b>65</b>
<b>Figure 3</b>	Mean values ( $\pm$ SD) of biofilm cells after treatment expressed as log <sub>10</sub> CFU/cm <sup>2</sup> for <i>S. mutans</i> (A) and <i>C. albicans</i> (B) single biofilms. NC = negative control (saliva); PC = Chlorhexidine gluconate (180 mg/L); P1 = AgNP+CaGP; P2 = AgNP. Different lowercase letters indicate significant difference among the treatments for <i>S. mutans</i> ( $p < 0.05$ ; Kruskal-Wallis test) and <i>C. albicans</i> biofilms ( $p < 0.05$ ; Student-Newman-Keuls test).....	<b>66</b>
<b>Capítulo 2</b>	<b>Evaluation of silver nanoparticles associated or not to calcium glycerophosphate on fibroblast viability and cytokine production.....</b>	<b>68</b>

---

---

<b>Figure 1</b>	X-ray diffraction (XRD) of the nanocomposites: C1 (AgNPs-CaGP) and C2 (AgNPs).....	81
<b>Figure 2</b>	A) Images of transmission electron microscopy (TEM) of the nanocompounds: a) C1 (AgNPs-CaGP) and b) C2 (AgNPs). TEM and EDS mapping of the 2D elements issuance Ca K $\alpha$ , P K $\alpha$ and Ag K $\alpha$ false color. Analysis of the distribution of silver nanoparticles on the CaGP (C1 nanocompound); a) TEM image; b-d) silver, calcium and phosphorus, respectively, demonstrating they are constituents of the C1.....	82
<b>Figure 3</b>	(A) Cytotoxicity of C1 (AgNPs-CaGP) and C2 (AgNPs) to fibroblasts (L929) after 24, 48, and 72 hours of treatment expressed as a percentage. The mean levels of proinflammatory cytokine (B) IL-6, SCF production by fibroblasts (L929) in the presence of different concentrations of C1 and C2 after 24, 48, and 72 hours expressed as pg/mL. Error bars indicate the standard deviations of the means. ***Significant increase ( $p < 0.001$ ) compared with the control group using ANOVA with the Bonferroni correction.....	83
<b>Capítulo 3</b>	<b>Antimicrobial activity of compounds containing silver nanoparticles and calcium glycerophosphate in combination with tyrosol.....</b>	85
<b>Figure 1</b>	SEM images of the AgNP-CaGP nanocompounds: (a) and (b): Compound obtained by the chemical process (C); (c) and (d): Compound obtained by the ‘green’ process (G).....	103
<b>Figure 2</b>	Mean value ( $\pm$ SD) of the logarithm of colony forming units per cm <sup>2</sup> ( $\log_{10}$ CFU/cm <sup>2</sup> ) for single biofilms of <i>C. albicans</i> and <i>S. mutans</i> . NC = negative control; C = nanocompound obtained by the chemical process; TYR = tyrosol. Concentrations tested for <i>C. albicans</i> : C at 4,000 $\mu$ g/mL and TYR at 6,908 $\mu$ g/mL. For <i>S. mutans</i> : C at 1,000 $\mu$ g/mL and TYR at 1,727 $\mu$ g/mL. Different lowercase and uppercase letters indicate significant differences among the treatments for <i>C. albicans</i> ( $p < 0.05$ ; Kruskal-Wallis	

---

---

	test followed by the Tukey test) and <i>S. mutans</i> ( $p < 0.05$ ; Kruskal-Wallis test) biofilms, respectively.....	104
<b>Figure 3</b>	Mean value ( $\pm$ SD) of the logarithm of colony forming units per $\text{cm}^2$ ( $\log_{10}$ CFU/ $\text{cm}^2$ ) for single biofilms of <i>C. albicans</i> . NC = negative control; G = nanocompound obtained by 'green' route at 7,810 $\mu\text{g/mL}$ ; TYR = tyrosol at 3,454 $\mu\text{g/mL}$ ; G+TYR = 7,810 $\mu\text{g/mL}$ of G and 3,454 $\mu\text{g/mL}$ of TYR. Different lowercase letters indicate significant differences among the treatments ( $p < 0.05$ ; Kruskal-Wallis test followed by the Student-Newman-Keuls test).....	105
<b>C�pulo 4</b>	<b>'Green' silver nanoparticles combined with tyrosol as potential oral antimicrobial therapy.....</b>	107
<b>Figure 1</b>	UV-Visible spectrum (A), XRD pattern and (C) SEM micrograph of the AgNPs. XRD: X-ray diffraction; SEM: Scanning electron microscopy; AgNPs: silver nanoparticles.....	123
<b>Figure 2</b>	Mean values ( $\pm$ SD) of the logarithm of colony forming units per $\text{cm}^2$ ( $\log_{10}$ CFU/ $\text{cm}^2$ ) for <i>C. albicans</i> and <i>S. mutans</i> single biofilms. NC = negative control (artificial saliva); TYR (tyrosol) at 7.8 mM and 1.25 mM; AgNPs (silver nanoparticles) at 244 $\mu\text{g/mL}$ and 39.05 $\mu\text{g/mL}$ for <i>C. albicans</i> and <i>S. mutans</i> , respectively. Different lowercase letters indicate significant difference among the treatments for <i>C. albicans</i> biofilm ( $p < 0.05$ ; Student-Newman-Keuls test) and capital letters for <i>S. mutans</i> biofilm ( $p < 0.05$ , Tukey test).....	124
<b>Figure 3</b>	Cytotoxicity of AgNPs, TYR and AgNPs+TYR to fibroblasts (L929) after 24, 48, and 72 hours of treatment expressed as a percentage. Error bars indicate the standard deviations of the means. *Significant difference ( $p < 0.001$ ) compared with the control group using ANOVA with the Bonferroni correction.....	125
<b>C�pulo 5</b>	<b>'Green'-synthesized silver nanoparticles inhibit growth, filamentation and biofilm formation prompted by <i>Candida albicans</i> and <i>Candida glabrata</i>.....</b>	127

---

---

<b>Figure 1</b>	MIC <sub>50</sub> values for the ‘green’ AgNPs against the reference (gray) and the oral isolates of <i>C. albicans</i> (A) and <i>C. glabrata</i> (B). FLC-resistant isolates are in black, while FLC-sensitives isolates are in white. AgNP – silver nanoparticles and FLC – fluconazole.....	148
<b>Figure 2</b>	Heat map representing the effect of ‘green’ AgNPs alone or in combination with FLC, NYT and AmB against <i>C. albicans</i> SC5314 or against the two identified FLC-resistant <i>C. albicans</i> isolates. *Combinations considered synergistic according to the fractional inhibitory concentration index (FICI).....	149
<b>Figure 3</b>	Effect of AgNPs in filamentation of <i>C. albicans</i> SC5314. <i>C. albicans</i> cells were cultivated in RPMI growth medium supplemented or not with 10% FBS in the presence or absence of the ‘green’ AgNPs (at 600 mg/L) at 37° C during 24 h, after which the percentage of cells undergoing filamentation was quantified as detailed in Materials and Methods. FBS – Fetal Bovine Serum; two-way ANOVA followed by the Sidak’s multiple comparisons test, $p < 0.05$ .....	150
<b>Figure 4</b>	Effect of ‘green’ AgNPs in biofilm formation prompted by <i>C. albicans</i> SC5314. (A) The biofilm formed by <i>C. albicans</i> SC5314 cells on the surface of polystyrene after 24 h of cultivation in RPMI medium supplemented or not with increasing concentrations of AgNPs was compared using the PrestoBlue assay, as described in Materials and Methods. In panels B, C and D are shown pictures obtained by SEM of the biofilm formed under the conditions described above in the absence (B) or presence of 600 mg/L of ‘green’ AgNPs; ****- $p$ -value below 0.05.....	151
<b>Figure 5</b>	Effect of ‘green’ AgNPs in biofilm formation prompted by <i>C. glabrata</i> CBS138. (A) The biofilm formed by <i>C. glabrata</i> CBS138 cells on the surface of polystyrene after 24 h of cultivation in RPMI medium supplemented or not with increasing concentrations of AgNPs was compared using the PrestoBlue assay, as described in Materials and Methods. In panels B, C and	

---

	D are shown pictures obtained by SEM of the biofilm formed under the conditions described above in the absence (B) or presence of 2.44 mg/L of ‘green’ AgNPs; ****- <i>p</i> -value below 0.05.....	152
<b>Figure 6</b>	Relative absorbance obtained with the PrestoBlue assay for biofilms <i>C. glabrata</i> CBS138 formed by 12 h (Early biofilm) and 24 h (Mature biofilm) and treated with ‘green’ AgNPs at 2.44 mg/L for 24 h. Error bars display standard deviation of the means. *Indicates significant differences ( $p < 0.05$ – two-way ANOVA followed by the Sidak post hoc test) between Control and AgNPs groups in the different conditions. AgNPs – silver nanoparticles...	153
<b>Figure S1</b>	MIC <sub>50</sub> values for the FLC against the reference (white) and the oral isolates of <i>C. albicans</i> (A) and <i>C. glabrata</i> (B). FLC-resistant isolates are in black, while FLC-sensitives isolates are in gray. FLC – fluconazole.....	154
<b>Figure S2</b>	The effect of ‘green’ AgNPs alone or in combination with FLC, NYT and AmB against <i>C. albicans</i> SC5314 or against the two identified FLC-resistant <i>C. albicans</i> isolates (FFULORAL1 and FFULORAL2). Combinations considered synergistic according to the fractional inhibitory concentration index (FICI).....	155
<b>Capítulo 6</b>	<b>Resposta transcriptômica de <i>Candida glabrata</i> após exposição às nanopartículas de prata sintetizadas por uma via ‘green’....</b>	157
<b>Figura 1</b>	(A) e (B): Valores de CIM <sub>50</sub> para Íon Ag <sup>+</sup> (A) e AgNPs (B) contra <i>C. glabrata</i> CBS138. A CIM foi determinada pelo método da microdiluição recomendado pelo EUCAST. Valores de CIM para cada composto está representado por uma seta. (C): Número de células cultiváveis dos biofilmes de <i>C. glabrata</i> CBS138 depois da formação do biofilme na presença ou na ausência do Íon Ag <sup>+</sup> e das AgNPs representado por UFC/mL; as concentrações utilizadas foram baseadas nos valores de CIM <sub>50</sub> (ANOVA 1-critério, seguido pelo teste de Dunnett, com $p < 0.05$ ).....	170
<b>Figura 2</b>	Curva de crescimento de <i>C. glabrata</i> CBS138 na presença ou na ausência das AgNPs (2,44 mg/L) expressa em densidade óptica	

---

	(DO <sub>600nm</sub> ) (A) e número de unidades formadora de colônias por mL (Log <sub>10</sub> UFC/mL) (B). Seta mostrando o ponto que as amostras foram recolhidas para extração de RNA.....	171
<b>Figura 3</b>	Agrupamento funcional de genes ativados em <i>C. glabrata</i> CBS138 (estado planctônico) em resposta às AgNPs por 2 h. Os genes encontrados ser <i>up-</i> (A) ou <i>down-regulated</i> (B) em resposta às AgNPs foram agrupados de acordo com a sua função biológica, usando o banco de dados do Catálogo Funcional MIPS (barras pretas), e as classes funcionais enriquecidas ( $p < 0,05$ ) foram selecionadas. As barras brancas representam a porcentagem de genes agrupados em cada classe funcional, utilizando como conjunto de dados de entrada todo o genoma de <i>C. glabrata</i> CBS138.....	172
<b>Figura 4</b>	Diagrama de Venn resumindo o número de genes <i>up-</i> ou <i>down-regulated</i> (acima de 1,5 vezes ( <i>fold</i> )) em resposta ao Íon Ag <sup>+</sup> e às AgNPs nas células de <i>C. glabrata</i> CBS138 formando biofilmes por 24 h.....	173
<b>Figura 5</b>	Agrupamento funcional de genes ativados em <i>C. glabrata</i> CBS138 (formando biofilmes) em resposta às AgNPs por 24 h. Os genes encontrados ser <i>up-</i> (A) ou <i>down-regulated</i> (B) em resposta às AgNPs foram agrupados de acordo com a sua função biológica, usando o banco de dados do Catálogo Funcional MIPS (barras pretas), e as classes funcionais enriquecidas ( $p < 0,05$ ) foram selecionadas. As barras brancas representam a porcentagem de genes agrupados em cada classe funcional, utilizando como conjunto de dados de entrada todo o genoma de <i>C. glabrata</i> CBS138.....	173

---

---

## LISTA DE TABELAS

<b>Capítulo 1</b>	<b>‘Green’ synthesis of silver nanoparticles combined to calcium glycerophosphate: antimicrobial and antibiofilm activities....</b>	39
<b>Table 1</b>	Concentration of ellagic acid (mg/g) and phenolic compounds (mg GA/g) at the pomegranate extracts.....	61
<b>Table 2</b>	Quantification of Ag <sup>+</sup> ions in the nanocomposites synthesized by the ‘green’ route.....	62
<b>Table 3</b>	Minimum fungicidal concentration (MFC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of the compounds against microorganisms tested.....	63
<b>Capítulo 3</b>	<b>Antimicrobial activity of compounds containing silver nanoparticles and calcium glycerophosphate in combination with tyrosol.....</b>	85
<b>Table 1</b>	Minimum inhibitory concentration (MIC) of tyrosol (TYR) and nanocompounds obtained by chemical (C) and ‘green’ (G) routes against <i>Streptococcus mutans</i> and <i>Candida albicans</i> , and fractional inhibitory concentration index (FICI).....	102
<b>Capítulo 4</b>	<b>‘Green’ silver nanoparticles combined with tyrosol as potential oral antimicrobial therapy.....</b>	107
<b>Table 1</b>	Minimum inhibitory concentration (MIC) of silver nanoparticles (AgNP) and tyrosol against <i>Streptococcus mutans</i> and <i>Candida albicans</i> and fractional inhibitory concentration index (FICI).....	122
<b>Capítulo 5</b>	<b>‘Green’-synthesized silver nanoparticles inhibit growth, filamentation and biofilm formation prompted by <i>Candida albicans</i> and <i>Candida glabrata</i>.....</b>	127
<b>Table 1</b>	Effect of fluconazole (FLC), amphotericin B (AmB) and nystatin (NYT) alone or in combination with ‘green’ silver nanoparticles (AgNPs) against FLC-resistant <i>Candida albicans</i> oral clinical isolates reference strain SC5314.....	147

---

---

<b>Capítulo 6</b>	<b>Resposta transcriptômica de <i>Candida glabrata</i> após exposição às nanopartículas de prata sintetizadas por uma via ‘green’ .....</b>	<b>157</b>
<b>Tabela 1</b>	Lista dos genes <i>up-regulated</i> em resposta às AgNPs por 2 h em <i>C. glabrata</i> CBS138 de acordo com os grupos funcionais obtidos pelo MIPS Functional ( <a href="http://mips.helmholtz-muenchen.de/funcatDB/">http://mips.helmholtz-muenchen.de/funcatDB/</a> ). A função biológica indicada foi baseada nas informações disponíveis em <i>Candida</i> Genome Database ( <a href="http://candidagenome.org">http://candidagenome.org</a> ) e/ou na informação disponível para ortólogo <i>S. cerevisiae</i> .....	174
<b>Tabela 2</b>	Lista dos genes <i>down-regulated</i> em resposta às AgNPs por 2 h em <i>C. glabrata</i> CBS138 de acordo com os grupos funcionais obtidas pelo MIPS Functional ( <a href="http://mips.helmholtz-muenchen.de/funcatDB/">http://mips.helmholtz-muenchen.de/funcatDB/</a> ). A função biológica indicada foi baseada nas informações disponíveis em <i>Candida</i> Genome Database ( <a href="http://candidagenome.org">http://candidagenome.org</a> ) e/ou na informação disponível para ortólogo <i>S. cerevisiae</i> .....	175
<b>Tabela 3</b>	Lista dos genes <i>up-regulated</i> em resposta às AgNPs por 24 h, exclusivamente (diagrama de Venn), em <i>C. glabrata</i> CBS138 (formando biofilmes) de acordo com os grupos funcionais obtidas pelo MIPS Functional ( <a href="http://mips.helmholtz-muenchen.de/funcatDB/">http://mips.helmholtz-muenchen.de/funcatDB/</a> ). A função biológica indicada foi baseada nas informações disponíveis em <i>Candida</i> Genome Database ( <a href="http://candidagenome.org">http://candidagenome.org</a> ) e/ou na informação disponível para ortólogo <i>S. cerevisiae</i> .....	176
<b>Tabela 4</b>	Lista dos genes <i>down-regulated</i> em resposta às AgNPs por 24 h, exclusivamente (diagrama de Venn), em <i>C. glabrata</i> CBS138 (formando biofilmes) de acordo com os grupos funcionais obtidas pelo MIPS Functional ( <a href="http://mips.helmholtz-muenchen.de/funcatDB/">http://mips.helmholtz-muenchen.de/funcatDB/</a> ). A função biológica indicada foi baseada nas informações disponíveis em <i>Candida</i> Genome Database ( <a href="http://candidagenome.org">http://candidagenome.org</a> ) e/ou na informação disponível para ortólogo <i>S. cerevisiae</i> .....	178

---

---

## SUMÁRIO

1. Introdução Geral.....	28
2. Capítulo 1 – ‘Green’ synthesis of silver nanoparticles combined to calcium glycerophosphate: antimicrobial and antibiofilm activities.....	39
2.1. Abstract.....	40
2.2. Introduction.....	41
2.3. Materials and methods.....	42
2.4. Results.....	47
2.5. Discussion.....	49
2.6. Conclusion.....	52
2.7. Future perspective.....	52
2.8. Executive Summary.....	53
2.9. References.....	53
3. Capítulo 2 – Evaluation of silver nanoparticles associated or not to calcium glycerophosphate on fibroblast viability and cytokine production.....	68
3.1. Abstract.....	69
3.2. Introduction.....	70
3.3. Materials and methods.....	71
3.4. Results.....	73
3.5. Discussion.....	74
3.6. References.....	76
4. Capítulo 3 – Antimicrobial activity of compounds containing silver nanoparticles and calcium glycerophosphate in combination with tyrosol.....	85
4.1. Abstract.....	86
4.2. Introduction.....	87
4.3. Materials and methods.....	88
4.4. Results.....	91
4.5. Discussion.....	92
4.6. References.....	95
5. Capítulo 4 – ‘Green’ silver nanoparticles combined with tyrosol as potential oral antimicrobial therapy.....	107
5.1. Abstract.....	108

---

---

5.2. Introduction.....	109
5.3. Materials and methods.....	110
5.4. Results.....	113
5.5. Discussion.....	114
5.6. References.....	116
6. Capítulo 5 – ‘Green’ synthesized silver nanoparticles inhibit growth, filamentation and biofilm formation prompted by <i>Candida albicans</i> and <i>Candida glabrata</i> .....	127
6.1. Abstract.....	128
6.2. Introduction.....	129
6.3. Materials and Methods.....	131
6.4. Results.....	134
6.5. Discussion.....	137
6.6. References.....	140
7. Capítulo 6 – Resposta transcriptômica de <i>Candida glabrata</i> após exposição às nanopartículas de prata sintetizadas por uma via ‘green’.....	157
7.1. Resumo.....	157
7.2. Introdução.....	158
7.2. Materiais e métodos.....	159
7.3. Resultados e Discussão.....	162
7.4. Conclusão.....	166
7.5. Referências.....	166
8. Considerações Finais.....	185

---

## INTRODUÇÃO GERAL

A cavidade bucal abriga nichos que permitem o crescimento de diversas comunidades de microrganismos – vírus, bactérias, fungos e protozoários (Wade, 2013). Estas comunidades persistem em todas as superfícies (tecidos moles ou duros) como biofilmes multiespécies formando, assim, a microbiota oral residente, que geralmente existe em harmonia com o hospedeiro. Os microrganismos encontrados dentro destes biofilmes orais vivem em proximidade um com outro, que resulta em uma ampla variedade de interações, que podem ser sinérgicas ou antagônicas. A composição da microbiota é influenciada pelo ambiente oral, e mudanças nas condições locais podem afetar as interações microbianas dentro destas comunidades orais e determinar, em parte, se a relação entre a microbiota oral e o hospedeiro é simbiótica ou potencialmente prejudicial, aumentando, assim, o risco de doenças como a cárie dentária ou a candidíase oral (Roberts e Darveau, 2015).

A cárie dentária é uma doença biofilme-sacarose dependente causada por ácidos provenientes da fermentação microbiana dos carboidratos da dieta que, com o tempo, causam a desmineralização dos tecidos duros do dente (Whitford *et al.*, 2002). Bactérias cariogênicas como *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, e lactobacilos são importantes na patogênese da cárie dentária (Balakrishnan *et al.*, 2000). Dentre essas bactérias, *S. mutans*, uma bactéria Gram-positiva anaeróbia facultativa, é um dos principais agentes etiológicos desta patologia. Os principais fatores de virulência de *S. mutans* que contribuem para a colonização da superfície do esmalte dentário e desenvolvimento de biofilmes são produção de polissacarídeos extra e intracelulares, produção de ácidos a partir de uma variedade de açúcares fermentáveis e tolerância ao baixo pH do ambiente (Krzyściak *et al.*, 2014). Embora o desenvolvimento da cárie esteja inicialmente relacionado à formação de biofilme cariogênico por *S. mutans*, a progressão de lesões estabelecidas pode incluir as espécies de *Candida*, particularmente *C. albicans*. Estudos microbiológicos de biofilmes de crianças com cárie precoce da infância revelaram que, além dos altos níveis de *S. mutans*, a *C. albicans*, um patógeno fúngico oportunista, também é frequentemente detectado (Raja *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012). Raja e colaboradores (2010) relataram que a ocorrência de cavidades dentárias em crianças está positivamente correlacionada com a frequência de candidíase oral. As leveduras podem facilitar a formação do biofilme pelos estreptococos, enquanto que estes melhoram as propriedades invasivas de *Candida* (Diaz *et al.* 2012; Xu *et al.*, 2014). Além disso, quando

a sacarose está presente, a interação entre esses microrganismos em termos de adesão (e co-agregação) é melhorada (Metwalli *et al.*, 2013).

A candidíase oral, por sua vez, é uma importante entidade dermatológica oral que pode estar presente na mucosa bucal, língua, gengiva e palato (Millsop *et al.*, 2016; Moyes *et al.*, 2015). *C. albicans* é a causa mais prevalente de candidíase oral devido a alguns fatores de virulência que este microrganismo possui, como por exemplo sua adesão às superfícies do hospedeiro, transição do estado de leveduras a hifas, e produção de enzimas extracelulares; a formação de hifas contribui na adesão à superfície da mucosa assim como auxilia a penetração no epitélio oral (Silva *et al.*, 2017; Rautemaa e Ramage, 2011). Entretanto, infecções causadas por outras espécies de *Candida* estão aumentando. Na candidíase oral, um aumento na frequência de *C. glabrata* tem sido observado (Miranda-Cadena *et al.*, 2018); este fato pode ser devido à maior resiliência às drogas da família dos azóis (especialmente o fluconazol) largamente utilizado no tratamento e na profilaxia de pacientes em risco (Tscherner *et al.*, 2011; Benett *et al.*, 2004).

O controle da formação de biofilmes orais não é uma tarefa fácil, mas, nos últimos anos, a Nanotecnologia tem sido amplamente utilizada em diversas áreas da saúde através da incorporação de nanopartículas em diversos materiais (médicos e dentários) a fim de controlar ou tratar biofilmes patogênicos, fornecendo, assim, novos tratamentos contra uma ampla gama de doenças (Noronha *et al.*, 2017; Ramasamy e Lee, 2016). Neste contexto, as nanopartículas de prata (NPsAg) tem ganhado considerável atenção no campo científico. Na forma nanoparticulada, a prata possui uma maior área de superfície por volume (esta característica aumenta a área de contato com o microrganismo), o que a torna potencialmente mais reativa (Chairuangkitti *et al.*, 2013). NPsAg possuem comprovada atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de microrganismos, bactérias, fungos e vírus, como por exemplo *S. mutans* (Fernandes *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2018; Perez-Diaz *et al.*, 2015), *Staphylococcus aureus* (Fernandes *et al.*, 2018), *Pseudomonas aeruginosa* (Chowdhury *et al.*, 2016), *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. guilliermondii* (Souza *et al.*, 2018; Soares M *et al.*, 2018; Monteiro *et al.*, 2015; Szweda *et al.*, 2015; Monteiro *et al.*, 2012; Wady *et al.*, 2012), incluindo cepas resistentes às drogas que são habitualmente usadas para tratar infecções causadas por estes microrganismos (Franci *et al.*, 2015; Ravishankar Rai e Jamuna Bai, 2011).

Muitos procedimentos físicos e químicos tem sido usados para sintetizar nanopartículas metálicas (Goodsell, 2014); entretanto, muitas dessas técnicas utilizam substâncias químicas tóxicas, podendo afetar o meio ambiente e o sistema biológico (Ali

*et al.*, 2016). Além disso, são técnicas extremamente caras. Assim, estas abordagens podem resultar em efeitos colaterais indesejáveis quando estas partículas forem utilizadas. Desta forma, um método alternativo para síntese de nanopartículas metálicas para reduzir seus efeitos citotóxicos se faz necessário. A síntese fitoquímica, onde compostos de diferentes plantas são utilizados na redução de íons, tem-se mostrado bastante eficaz na produção de nanopartículas, fornecendo compostos menos tóxicos e economicamente mais viáveis (Roy *et al.*, 2013). A *Punica granatum* L. (romã) é uma planta que tem sido utilizada na medicina para o tratamento de distúrbios causados por estresse oxidativo (Rao *et al.*, 2013; Jurenka, 2008; Lansky e Newman, 2007). Diferentes partes da planta, incluindo as folhas, apresentam excelentes propriedades anti-oxidantes (Pande *et al.*, 2009). O extrato da casca da romã tem sido bastante utilizado na síntese das NPsAg (Fernandes *et al.*, 2018; Souza *et al.*, 2018; Nasiriboroumand *et al.*, 2018; Goudarzi *et al.*, 2016; Edison e Sethuraman, 2013) uma vez que a casca da romã é uma fonte importante de substâncias fenólicas incluindo taninos, ácidos elágico e gálico, etc que são agentes antioxidantes responsáveis pela redução do sal de prata (Goudarzi *et al.*, 2016; Ahmad *et al.*, 2012).

Além das NPsAg, compostos à base de fosfato de cálcio estão sendo desenvolvidos com o intuito de prevenir a cárie dentária bem como preservar também a vitalidade pulpar e estimular a formação de uma barreira de dentina (Xu *et al.*, 2011). Estes materiais podem liberar íons de cálcio (Ca) e fosfato inorgânico (P) a fim de remineralizar lesões dentárias (Xie *et al.*, 2016). Muitos estudos tem demonstrado bons resultados na remineralização do esmalte com polifosfatos (Dalpasquale *et al.*, 2017; Danelon *et al.*, 2017; Amaral *et al.*, 2014; Zaze *et al.*, 2014). Entre estes compostos, o glicerofosfato de cálcio (GPCa), que é usado como uma fonte de Ca e P, tem demonstrado propriedades anti-cariogênicas (Nagata *et al.*, 2017; Freire *et al.*, 2016). Além disso, Imai e Hayashi (1993) demonstraram que o  $\beta$ -GPCa, um dos isômeros do GPCa (Inoue, 1980) utilizado como capeamento pulpar direto em um estudo animal foi convertido imediatamente em hidroxiapatita no assoalho da cavidade. Desta forma, devido à complexidade dos biofilmes orais e o desenvolvimento da cárie, a associação das NPsAg com GPCa pode resultar em um biomaterial promissor com forte atividade antimicrobiana e propriedades de remineralização desejáveis.

Entretanto, existe uma preocupação em relação a dose das NPsAg utilizada, uma vez que uma toxicidade dose-dependente em fibroblastos (L929) tem sido documentada (Takamiya *et al.*, 2016). Uma outra questão a ser levada em consideração seria o

aparecimento de isolados clínicos resistentes a drogas convencionais. Portanto, o uso combinado destas soluções antimicrobianas (NPsAg e NPsAg-GPCa) com outros compostos em baixas concentrações poderia aumentar a eficácia antimicrobiana contra biofilmes resistentes e reduzir os efeitos colaterais destes agentes. Neste sentido, Sun e colaboradores (2016) obtiveram bons resultados com o uso combinado das NPsAg com fluconazol contra isolados clínicos resistentes aos azóis. Longhi e colaboradores (2016) também demonstraram uma diminuição na viabilidade de biofilmes maduros de cepas resistentes aos azóis com o uso de fluconazol em combinação com NPsAg produzidas por uma via fitoquímica. Moléculas de sinalização, conhecidas como *Quorum-Sensing* (QS) tem sido testadas como agentes antimicrobianos alternativos (Albuquerque e Casadevall, 2012; Monteiro *et al.*, 2015). Neste sentido, o tirosol (TIR) mostrou propriedades antibiofilme contra espécies de *Candida* e *S. mutans* em biofilmes simples e mistos (Arias *et al.*, 2016). Sendo assim, a associação das NPsAg (com ou sem GPCa) com antifúngicos utilizados na prática clínica (fluconazol, nistatina e anfotericina B) bem como com estas moléculas de sinalização pode ser uma estratégia viável para combater infecções resistentes às terapias convencionais e para reduzir os efeitos colaterais destes compostos.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana/antibiofilme e a viabilidade celular de nanopartículas de prata (NPsAg) obtidas por uma síntese ‘green’ associadas ou não ao  $\beta$ -glicerofosfato de cálcio (GPCa) contra *Streptococcus mutans* e espécies de *Candida* (cepas de referência e isolados clínicos orais incluindo cepas resistentes ao fluconazol). O efeito destes nanocompostos em combinação com o tirosol, fluconazol, nistatina e anfotericina B também foi determinado. Além disso, nós avaliamos comparativamente as alterações do transcriptoma de células de *C. glabrata* CBS138 após exposição às NPsAg e ao Íon prata.

Para abordar o tema proposto, o estudo será apresentado em seis capítulos distintos, conforme descrito abaixo:

- Capítulo 1: **“Green synthesis of silver nanoparticles combined to calcium glycerophosphate: antimicrobial and antibiofilm activities”** (Artigo publicado no periódico *Future Microbiology*);
- Capítulo 2: **“Evaluation of silver nanoparticles associated or not to calcium glycerophosphate on fibroblast viability and cytokine production”** (Artigo formatado nas normas do periódico *Clinical Oral Investigations* - [www.springer.com/medicine/dentistry/journal/784?detailsPage=plci\\_1060698](http://www.springer.com/medicine/dentistry/journal/784?detailsPage=plci_1060698));

- Capítulo 3: “**Antimicrobial activity of compounds containing silver nanoparticles and calcium glycerophosphate in combination with tyrosol**” (Artigo formatado nas normas do periódico *Journal of Applied Microbiology* - [onlinelibrary.wiley.com/page/journal/13652672/homepage/forauthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/13652672/homepage/forauthors.html));
- Capítulo 4: “**Green silver nanoparticles combined with tyrosol as potential oral antimicrobial therapy**” (Artigo formatado nas normas do periódico *Journal of Applied Microbiology* - [onlinelibrary.wiley.com/page/journal/13652672/homepage/forauthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/13652672/homepage/forauthors.html));
- Capítulo 5: “**Green-synthesized silver nanoparticles are strong inhibitors of *Candida albicans* and *Candida glabrata***” (Artigo formatado nas normas do periódico *Medical Mycology* - [academic.oup.com/mmy/pages/Manuscript\\_Preparation](http://academic.oup.com/mmy/pages/Manuscript_Preparation));
- Capítulo 6: “**Resposta transcriptômica de *Candida glabrata* após exposição às nanopartículas de prata sintetizadas por uma via ‘green’**”.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res.* 2013; 69(1): 137-143.
2. Roberts FA, Darveau RP. Microbial protection and virulence in periodontal tissue as a function of polymicrobial communities: symbiosis and dysbiosis. *Periodontol 2000.* 2015; 69(1): 18-27.
3. Whitford GM, Wasdin JL, Schafer TE, Adair SM. Plaque fluoride concentrations are dependent on plaque calcium concentrations. *Caries Res.* 2002; 36(4): 256-265.
4. Balakrishnan M, Simmonds RS, Tagg JR. Dental caries is a preventable infectious disease. *Aus Dent J.* 2000; 45(4): 235-245.
5. Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014; 33(4): 499-515.
6. Raja M, Hannan A, Ali K. Association of oral candidal carriage with dental caries in children. *Caries Res.* 2010; 44(3): 272-276.

7. Yang XQ, Zhang Q, Lu LY, Yang R, Liu Y, Zou J. Genotypic distribution of *Candida albicans* in dental biofilm of Chinese children associated with severe early childhood caries. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(8): 1048-1053.
8. Diaz PI, Xie Z, Sobue T, *et al.* Synergistic interaction between *Candida albicans* and commensal oral streptococci in a novel in vitro mucosal model. *Infect Immun.* 2012; 80(2): 620-632.
9. Xu H, Jenkinson HF, Dongari-Bagtzoglou A. Innocent until proven guilty: mechanisms and roles of *Streptococcus-Candida* interactions in oral health and disease. *Mol Oral Microbiol.* 2014; 29(3): 99-116.
10. Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: a sticky situation. *PLoS Pathog.* 2013; 9(10): e1003616.
11. Millsop JW, Fazel N. Oral candidiasis. *Clin Dermatol* 2016; 34(4): 487-94.
12. Moyes DL, Richardson JP, Naglik JR. *Candida albicans*-epithelial interactions and pathogenicity mechanisms: scratching the surface. *Virulence* 2015; 6(4): 338-46.
13. Silva S, Rodrigues CF, Araujo D, Rodrigues ME, Henriques M. *Candida* Species Biofilms' Antifungal Resistance. *J Fungi (Basel)* 2017; 3(1).
14. Rautemaa R, Ramage G. Oral candidosis--clinical challenges of a biofilm disease. *Crit Rev Microbiol* 2011; 37(4): 328-36.
15. Miranda-Cadena K, Marcos-Arias C, Mateo E, *et al.* Prevalence and antifungal susceptibility profiles of *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and their close-related species in oral candidiasis. *Arch Oral Biol* 2018; 95: 100-107.
16. Tscherner M, Schwarzmüller, T., Kuchler, K. Pathogenesis and antifungal drug resistance of the human fungal pathogen *Candida glabrata*. *Pharmaceuticals (Basel)* 2011; 4: 169-186.
17. Bennett JE, Izumikawa K, Marr KA. Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(5): 1773-7.
18. Noronha VT, Paula AJ, Durán G, *et al.* Silver nanoparticles in dentistry. *Dent Mater.* 2017; 33(10): 1110-1126.
19. Ramasamy M, Lee J. Recent Nanotechnology Approaches for Prevention and Treatment of Biofilm-Associated Infections on Medical Devices. *Biomed Res Int* 2016; 1851242.

20. Chairuangkitti P, Lawanprasert S, Roytrakul S, *et al.* Silver nanoparticles induce toxicity in A549 cells via ROS-dependent and ROS-independent pathways. *Toxicol In Vitro* 2013; 27(1): 330-338.
21. Fernandes GL, Delbem ACB, do Amaral JG, *et al.* Nanosynthesis of Silver-Calcium Glycerophosphate: Promising Association against Oral Pathogens. *Antibiotics (Basel)* 2018; 7(3).
22. Souza JA, Barbosa DB, Berretta AA, *et al.* Green synthesis of silver nanoparticles combined to calcium glycerophosphate: antimicrobial and antibiofilm activities. *Future Microbiol* 2018; 13: 345-357.
23. Perez-Diaz MA, Boegli L, James G, *et al.* Silver nanoparticles with antimicrobial activities against *Streptococcus mutans* and their cytotoxic effect. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2015; 55: 360-6.
24. Fernandes RA, Berretta AA, Torres EC, *et al.* Antimicrobial Potential and Cytotoxicity of Silver Nanoparticles Phytosynthesized by Pomegranate Peel Extract. *Antibiotics (Basel)* 2018; 7(3).
25. Chowdhury NR, MacGregor-Ramiasa M, Zilm P, Majewski P, Vasilev K. 'Chocolate' silver nanoparticles: Synthesis, antibacterial activity and cytotoxicity. *J Colloid Interface Sci* 2016; 482: 151-158.
26. Soares M, Correa RO, Stroppa PHF, *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles using *Caesalpinia ferrea* (Tul.) Martius extract: physicochemical characterization, antifungal activity and cytotoxicity. *PeerJ* 2018; 6: e4361.
27. Monteiro DR, Takamiya AS, Feresin LP, *et al.* Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms to silver nanoparticles in intermediate and mature development phases. *J Prosthodont Res* 2015; 59(1): 42-8.
28. Szweda P, Gucwa K, Kurzyk E, *et al.* Essential Oils, Silver Nanoparticles and Propolis as Alternative Agents Against Fluconazole Resistant *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida krusei* Clinical Isolates. *Indian J Microbiol* 2015; 55(2): 175-83.
29. Monteiro DR, Silva S, Negri M, *et al.* Silver nanoparticles: influence of stabilizing agent and diameter on antifungal activity against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Lett Appl Microbiol* 2012; 54(5): 383-91.
30. Wady AF, Machado AL, Zucolotto V, *et al.* Evaluation of *Candida albicans* adhesion and biofilm formation on a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles. *J Appl Microbiol* 2012; 112(6): 1163-72.

31. Franci G, Falanga A, Galdiero S, *et al.* Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules* 2015; 20: 8856-8874.
32. Ravishankar Rai V, Jamuna Bai A. Nanoparticles and their potential application as antimicrobials. In *Science against Microbial Pathogen: Communicating Current Research and Technological Advances*; Méndez-Vilas A., Ed.; Formatex Research Center: Badajoz, Spain, 2011; Volume 2, pp. 197-202.
33. Goodsell DS. *Bionanotechnology: Lessons from Nature*. John Wiley & Sons Publication, 2014.
34. Ali M, Kim B, Belfield KD, *et al.* Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Artemisia absinthium* aqueous extract – A comprehensive study. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2016; 58: 359-365.
35. Roy N, Gaur A, Jain A, Bhattacharya S, Rani V. Green synthesis of silver nanoparticles: an approach to overcome toxicity. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2013; 36(3): 807-812.
36. Rao A, Mahajan K, Bankar A, *et al.* Facile synthesis of size-tunable gold nanoparticles by pomegranate (*Punica granatum*) leaf extract: Applications in arsenate sensing. *Mater Res Bull.* 2013; 48(3): 1166-1173.
37. Jurenka JS. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum* L.): a review. *Altern Med Rev.* 2008; 13(2): 128-144.
38. Lansky EP, Newman RA. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol.* 2007; 109(2): 177-206.
39. Pande G, Akoh CC. Antioxidant capacity and lipid characterization of six Georgia-grown pomegranate cultivars. *J Agric Food Chem.* 2009; 57(20): 9427-9436.
40. Nasiriboroumand M, Montazer M, Barani H. Preparation and characterization of biocompatible silver nanoparticles using pomegranate peel extract. *J Photochem Photobiol B.* 2018; 179: 98-104.
41. Goudarzi M, Mir N, Mousavi-Kamazani M, Bagheri S, Salavati-Niasari M. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles prepared from two novel natural precursors by facile thermal decomposition methods. *Sci Rep.* 2016; 6: 32539.
42. Edison TJ, Sethuraman MG. Biogenic robust synthesis of silver nanoparticles using *Punica granatum* peel and its application as a green catalyst for the reduction

- of an anthropogenic pollutant 4-nitrophenol. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2013; 104: 262-264.
43. Ahmad N, Sharma S, Rai R. Rapid green synthesis of silver and gold nanoparticles using peels of *Punica granatum*. *Adv Mat Lett.* 2012; 3(5): 376-380.
44. Xu HH, Moreau JL, Sun L, Chow LC. Nanocomposite containing amorphous calcium phosphate nanoparticles for caries inhibition. *Dent Mater.* 2011; 27(8): 762-769.
45. Xie X, Wang L, Xing D, *et al.* Protein-repellent and antibacterial functions of a calcium phosphate rechargeable nanocomposite. *J Dent.* 2016; 52: 15-22.
46. Dalpasquale G, Delbem ACB, Pessan JP, *et al.* Effect of the addition of nano-sized sodium hexametaphosphate to fluoride toothpastes on tooth demineralization: an in vitro study. *Clin Oral Investig.* 2017; 21(5): 1821-1827.
47. Danelon M, Pessan JP, Souza-Neto FN, de Camargo ER, Delbem AC. Effect of fluoride toothpaste with nano-sized trimetaphosphate on enamel demineralization: An in vitro study. *Arch Oral Biol.* 2017; 78: 82-87.
48. Amaral JG, Freire IR, Valle-Neto EF, Cunha RF, Martinhon CC, Delbem AC. Longitudinal evaluation of fluoride levels in nails of 18-30-month-old children that were using toothpastes with 500 and 1,100 µg F/g. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2014; 42(5): 412-419.
49. Zaze AC, Dias AP, Amaral JG, Miyasaki ML, Sasaki KT, Delbem AC. In situ evaluation of low-fluoride toothpastes associated to calcium glycerophosphate on enamel remineralization. *J Dent.* 2014; 42(12): 1621-1625.
50. Nagata ME, Delbem AC, Hall KB, Buzalaf MA, Pessan JP. Fluoride and calcium concentrations in the biofilm fluid after use of fluoridated dentifrices supplemented with polyphosphate salts. *Clin Oral Investig.* 2017; 21(3): 831-837.
51. Freire IR, Pessan JP, Amaral JG, Martinhon CC, Cunha RF, Delbem AC. Anticaries effect of low-fluoride dentifrices with phosphates in children: A randomized, controlled trial. *J Dent.* 2016; 50: 37-42.
52. Imai M, Hayashi Y. Ultrastructure of wound healing following direct pulp capping with calcium-beta-glycerophosphate (Ca-BGP). *J Oral Pathol Med.* 1993; 22(9): 411-417.
53. Inoue M. Physicochemical studies on calcium glycerophosphate. I. X-Ray diffraction study of calcium glycerophosphate crystals and their water of crystallization. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1980; 28(5): 5.

54. Takamiya AS, Monteiro DR, Bernabé DG, *et al.* *In Vitro* and *In Vivo* Toxicity Evaluation of Colloidal Silver Nanoparticles Used in Endodontic Treatments. *J Endod.* 2016; 42: 953-960.
55. Sun L, Liao K, Li Y, *et al.* Synergy between polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles and azole antifungal against drug-resistant *Candida albicans*. *J Nanosci Nanotechnol.* 2016; 16(3): 2325-2335.
56. Longhi C, Santos JP, Morey AT, *et al.* Combination of fluconazole with silver nanoparticles produced by *Fusarium oxysporum* improves antifungal effect against planktonic cells and biofilm of drug-resistant *Candida albicans*. *Med Mycol.* 2016; 54(4): 428-432.
57. Albuquerque P, Casadevall A. Quorum sensing in fungi – a review. *Med Mycol.* 2012; 50: 337-345.
58. Monteiro DR, Feresin LP, Arias LS, Barão VA, Barbosa DB, Delbem AC. Effect of tyrosol on adhesion of *Candida albicans* and *Candida glabrata* to acrylic surfaces. *Med Mycol.* 2015; 53: 656-665.
59. Arias LS, Delbem AC, Fernandes RA, Barbosa DB, Monteiro DR (2016) Activity of tyrosol against single and mixed-species oral biofilms. *J Appl Microbiol.* 2016; 120: 1240-1249.

**CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o Capítulo 1, nós concluímos que:

- É possível obtermos um novo biomaterial contendo em sua composição nanopartículas de prata (NPsAg) (obtidas por uma síntese ‘green’ utilizando diferentes partes de uma romã) e fosfato de cálcio ( $\beta$ -glicerofosfato de cálcio - GPCa) conferindo a este material propriedades antimicrobianas e remineralizadoras;
- Estes compostos apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. mutans* e *C. albicans*, importantes patógenos orais relacionados com a cárie dentária e a candidíase bucal;
- Além disso, os nanocompósitos (NPsAg e NPsAg-GPCa) obtidos com o extrato da casca da romã apresentaram atividade antibiofilme semelhante e até mesmo melhor do que a clorexidina contra *S. mutans*.

Os Capítulos 2, 3, 4, 5 e 6 foram desenvolvidos com soluções antimicrobianas obtidas com o extrato da casca da romã. Com o Capítulo 2, concluí-se que:

- Estes nanocompósitos (NPsAg e NPsAg-GPCa) não foram citotóxicos às células L929 (fibroblastos) e estimularam a liberação de fator de crescimento celular o que pode favorecer o reparo tecidual em um processo inflamatório.

Os Capítulos 3 e 4 concluíram que:

- O uso combinado destas soluções antimicrobianas (NPsAg e NPsAg-GPCa) com o Tirosol pode ser uma alternativa viável contra patógenos orais.

No Capítulo 5, apenas as NPsAg foram avaliadas. É possível observar que:

- As NPsAg foram efetivas contra isolados clínicos orais de espécies de *Candida* (*C. albicans* e *C. glabrata*) incluindo isolados resistentes ao fluconazol. As células de *C. glabrata* foram mais susceptíveis às NPsAg. Além disso, houve uma redução no número de células de *C. albicans* que se mostraram com filamentação quando biofilmes foram formados na presença das NPsAg. Houve, também, uma redução na formação do biofilme das espécies de *Candida* na presença desta solução antimicrobiana;

- A combinação das NPsAg com diferentes agentes antifúngicos (fluconazol, nistatina e anfotericina B) foi eficaz contra os isolados clínicos orais resistentes ao fluconazol mostrando um efeito sinérgico.

E, por fim, no Capítulo 6, uma análise transcriptômica foi realizada a fim de avaliar quais genes estão mais ou menos expressos como resposta à exposição às NPsAg. A resposta transcriptômica das células de *C. glabrata* CBS138 frente às NPsAg foi determinada em duas situações: nos estados planctônico e formando biofilmes. A resposta transcriptômica das células expostas às NPsAg formando biofilmes foi comparada com a do íon  $\text{Ag}^+$ . Com este estudo, pode-se concluir que:

- No estado planctônico, os genes relacionados com a biossíntese de metionina e de lisina estão mais expressos, enquanto que os genes relacionados com o transporte transmembrana estão menos expressos;
- As células expostas às NPsAg responderam de forma distinta em relação ao Íon  $\text{Ag}^+$ , na formação do biofilme de *C. glabrata*;
- As NPsAg exercem o seu efeito na membrana citoplasmática da célula fúngica. Além disso, nós observamos efeitos distintos entre o Íon  $\text{Ag}^+$  e as NPsAg na formação do biofilme.